

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 65, Number 312 (2015), 124 – 128

**SELECTION OF ACTIVE STRAINS OF OIL-OXIDIZING
MICROORGANISMS ISOLATED FROM COASTAL SOILS
OF THE NORTHERN CASPIAN**

**A. K. Sadanov, S. A. Aitkeldiyeva, E. R. Faizulina, O. N. Auezova, L. G. Tatarkina,
G. B. Baimakhanova, A. M. Nurmukhanbetova, G. A. Spankulova**

RSE "Institute of Microbiology and Virology" CS MES RK, Almaty, Kazakhstan.
E-mail: ecomicrolab@gmail.com

Keywords: oil-oxidizing microorganisms, sea water, sediments, coastal soils, screening, destruction, oil-oxidizing activity

Abstract. 125 bacterial cultures were isolated from the coastalwater, sediments and soils of the Northern Caspian. Screening has shown that the isolated culture differently disposed of a mixture of oils from different deposits of the Caspian region (Zhanazhol, Tengiz, Buzachi, Kashagan). 16 soil cultures, 7water cultures and 12 cultures isolated from sediments were the most active.In their cultivation the oil film disappeared from the surface of medium, and there was a large increase in biomass. As a result of the gravimetric determination of residual oil it found that the degradation of oil was 38.4-85.5%. 11 soil cultures, 5 - from the bottom sediments, and only one culture from the coastal watersshowed the highest activity. All of them utilized more than 50% of oil during 14 days.

УДК 579.66: 579.68: 579.083.13

**ОТБОР АКТИВНЫХ ШТАММОВ НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ
МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПРИБРЕЖНЫХ ВОД,
ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ И ПОЧВ СЕВЕРНОГО КАСПИЯ**

**А. К. Саданов, С. А. Айткельдиева, Э. Р. Файзулина, О. Н. Аузрова, Л. Г. Татаркина,
Г. Б. Баймаханова, А. М. Нурмуханбетова, Г. А. Спанкулова**

РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, Алматы, Казахстан

Ключевые слова: нефтеокисляющие микроорганизмы, морская вода, донные отложения, прибрежные почвы, скрининг, деструкция, нефтеокисляющая активность.

Аннотация. Из прибрежных вод, донных отложений и почв Северного Каспия выделена 125 бактериальных культур. Проведенный скрининг показал, что выделенные культуры по-разному утилизировали смесь нефтей различных месторождений прикаспийского региона (Жанажол, Тенгиз, Бузачи, Караган). Наиболее активными были 18 почвенных, 7 водных и 12 выделенных из донных отложений культур. При их культивировании с поверхности среды исчезала нефтяная пленка, и наблюдался большой прирост биомассы. По результатам гравиметрического определения остаточной нефти установлено, что деструкция нефти составляла 38,4-85,5%. Наибольшую активность показали 11 почвенных культур, 5 – из донных отложений и только одна культура – из прибрежной воды. Все они утилизировали за 14 суток более 50% нефти.

Введение. Развитие научно-технического прогресса неразрывно связано с ростом добычи нефти, который сопровождается увеличением нагрузок на природную среду. Загрязнение нефтью и нефтепродуктами является одним из самых сложных видов технологического воздействия на

природные экосистемы. Попадая в водную и почвенную среду, нефтяные углеводороды вызывают нарушение биологического равновесия в течение длительного времени. Отдельные нефтедобывающие регионы по состоянию окружающей среды приближаются к районам экологического бедствия, в которых возникли угроза устойчивой, а часто необратимой трансформации условий функционирования природных экосистем и ухудшения качества жизни людей [1-3].

Нефтяное загрязнение приводит к необратимым изменениям биологического равновесия и разнообразия. В результате разливов нефти почвы могут превращаться в типичные техногенные пустыни, в которых практически полностью подавлена жизнедеятельность биоты. Хронические разливы нефти приводят к быстрой и полной деградации ландшафтов [4, 5].

В связи с этим, проблемы, связанные с разработкой способов и методов защиты окружающей среды от нефти и нефтепродуктов, в настоящее время являются крайне острыми и актуальными.

Большинство технологий механической и физико-химической очистки многостадийны, трудоемки и требуют больших материальных затрат. В этой связи во многих странах становятся приоритетными биотехнологические методы ликвидации загрязнений окружающей среды.

В комплексе процессов очищения почвенных экосистем ведущее место принадлежит биологическим факторам, а именно углеводородокисляющим микроорганизмам (УОМ). Благодаря их деятельности, нефть трансформируется до простых соединений. Биодеградация углеводородов природными популяциями микроорганизмов представляет собой один из основных механизмов самоочищения окружающей среды [6-9].

Цель исследования – выделение и отбор активных штаммов нефтеокисляющих микроорганизмов из нефтезагрязненных прибрежных почв Северного Каспия.

Материалы и методы исследований

Пробы воды и донных отложений были отобраны по ГОСТу 17.1.5.01 – 80 [10]. Для отбора проб воды использовался погружной бутиль Burkle для жидкостей в соответствии с DINEN 58. Почвенные образцы отбирали с горизонта 0-20 см методом конверта [11].

Выделение нефтеокисляющих бактерий из отобранных образцов проводили методом накопительных культур на среде Ворошиловой-Диановой (ВД) с 1% нефтяной смеси месторождений Жанажол, Тенгиз, Бузачи, Караган (1:1:1:1). Колбы инкубировали в условиях аэрации на шейкере при 180 об/мин. Затем проводили высев на чашки Петри со средой РПА и инкубировали при температуре 28°C. Выросшие колонии проверяли на чистоту и отсеивали на косяки с РПА.

Способность выделенных культур расти на нефти изучали на среде ВД с 1% нефтяной смеси. Рост оценивали визуально по 4-балльной шкале на 14-е сутки [12]. Остаточное содержание нефти в среде определяли гравиметрическим методом [13].

Результаты исследования

Отбор проб прибрежных вод, донных отложений и почв Каспийского моря проводили в весенний период на территории Государственного природного резервата «АқЖайық». Из отобранных образцов в лабораторных условиях были поставлены накопительные культуры с 1% нефтяной смесью. Через 14 суток из них был произведен высев на чашки Петри со средой РПА с целью выделения чистых культур нефтеокисляющих микроорганизмов.

В результате проведенной работы из водных проб было выделено 32 бактериальные культуры, из донных отложений – 45 культур, из почвы – 51 культура. Штаммы отличались по цвету, форме, размеру, поверхности колоний. Встречались колонии как бесцветные, так и пигментированные.

Каждая культура проверялась на чистоту и высевалась на косяки с РПА для дальнейших исследований.

Среди бактериальных культур, выделенных из морской воды, донных отложений и прибрежной почвы, провели отбор штаммов микроорганизмов, обладающих способностью к утилизации углеводородов нефти. В качестве единственного источника углерода и энергии использовали нефтяную смесь в количестве 1%. О биодеструкции углеводородов нефти судили по изменению

или исчезновению нефтяной пленки на поверхности среды, стенках колб и по накоплению биомассы.

В результате из 32 бактериальных изолятов, выделенных из морской воды, 7 культур показали наибольшую активность 4 балла. При их культивировании нефть сильно видоизменилась: цвет стал светло-коричневым, структура нефти - мелкодисперсной, наблюдался большой прирост биомассы. Активность 15 культур оценена на 3 балла, 8 культур – на 2 балла. Две культуры показали очень слабый рост.

Из 45 штаммов бактерий, выделенных из донных отложений, наибольшую активность 4 балла показали 9 культур. Активность 3-х культур оценена на 3 балла, 23-х культур – на 2 балла. Остальные изоляты показали очень слабый рост.

Среди культур, выделенных из прибрежных почв, наибольшая активность отмечена у 18 изолятов, 12 показали активность в 3 балла. Остальные культуры не росли в присутствии нефти или показали слабый рост.

У отобранных бактериальных изолятов, визуально показавших высокую активность при росте на нефтяной смеси, была определена степень деструкции нефти гравиметрическим методом.

Известно, что углеводородокисляющая микрофлора присутствует во всех биоценозах, но не все микроорганизмы способны сохранять нефтеокисляющую активность длительное время. Наши исследования предполагают отбор истинных углеводородокисляющих микроорганизмов, у которых способность деградировать нефть является постоянным признаком.

Среди отобранных водных микроорганизмов таким изолятом оказалась одна культура 16ВК, которая сохранила свою активность на протяжении ряда последовательных пересевов на минеральной среде с нефтью (таблица 1). При ее культивировании степень деструкции нефти составила 68,8% за 14 суток. У остальных культур нефтеокисляющая активность снизилась по сравнению с первоначальной, при этом они утилизировали менее 50% нефти.

Таблица 1 – Деструкция нефтяной смеси микроорганизмами, выделенными из прибрежной воды

Культура	Степень деструкции, %	Культура	Степень деструкции, %
5ВК	40,2	16ВК	68,8
7ВК	42,6	17ВК	43,5
8ВК	46,0	29ВК	43,8
12ВК	44,3	Контроль	18,8

Среди культур, выделенных из донных осадков, 5 сохранили высокую способность утилизировать нефтяные углеводороды (таблица 2). Содержание нефти в среде снижалось на 56,4-67,3%. Наиболее эффективными культурами, выделенными из этого биоценоза, были штаммы 9ДК и 3ДК, степень деструкции нефти при их культивировании составила 63,3 и 67,3% соответственно. Остальные культуры снижали содержание нефти на 38,7-47,5%.

Таблица 2 – Деструкция нефтяной смеси микроорганизмами, выделенными из донных отложений

Культура	Степень деструкции, %	Культура	Степень деструкции, %
1ДК	56,4	37ДК	44,0
3ДК	67,3	38ДК	58,6
5ДК	59,8	43ДК	47,4
9ДК	63,3	44ДК	45,3
10ДК	47,5	45ДК	42,3
20ДК	47,0	Контроль	18,8
32ДК	38,7		

Среди проверенных почвенных культур 7 штаммов утилизировали 38,4-49,2% нефти, 2 штамма – 50,9 и 55,9% (таблица 3). У 9 культур деструкция нефти превышала 60%. Самыми активными были штаммы 27ПК, 39ПК и 49ПК, утилизация нефти при их культивировании составляла 75,6%, 85,5% и 77,9% соответственно.

Таблица 3 – Деструкция нефтяной смеси микроорганизмами, выделенными из прибрежной почвы

Культура	Степень деструкции, %	Культура	Степень деструкции, %
3ПК	66,9	33ПК	49,2
7ПК	64,5	34ПК	55,9
9ПК	45,6	39ПК	85,5
11ПК	38,4	41ПК	41,3
15ПК	50,9	42ПК	62,6
16ПК	41,8	46ПК	66,6
17ПК	49,0	49ПК	77,9
22ПК	65,7	51ПК	60,7
26ПК	44,2	Контроль	18,8
27ПК	75,6		

При проверке естественной убыли нефти в жидкой среде (контроль) она составила 18,8%.

Таким образом, результаты исследования показали, что наибольшее число активных микроорганизмов-нефтедеструкторов было выделено из прибрежных почв – 11 культур, 5 – из донных отложений и только одна культура – из прибрежной воды. Все они утилизировали за 14 суток более 50% нефти. Отобранные нефтеокисляющие культуры послужат основой для создания эффективных ассоциаций микроорганизмов, способных утилизировать нефтяные загрязнения в воде, донных отложениях и прибрежной почве.

Источник финансирования исследований. Министерство образования и науки Республики Казахстан.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Лапина Г.П., Чернавская Н.М., Литвиновский М.Е., Сазонова С.В. Физико-химические характеристики загрязнения окружающей среды при техногенных катастрофах (разлив нефти) // Химическая и биологическая безопасность. – 2007. – №1 (31). – С. 24-32.
- [2] Башкин В.Н., Галиулин Р.В., Галиуллина Р.А. Аварийные разливы углеводородов в водную среду: проблемы и пути их решения // Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. – 2010. – №11. – С. 4-7.
- [3] Amadi A., Dickson A.A., Maate G.O. Remediation of oil polluted soils. Organic and inorganic nutrient supplements on the performance of Maize //Water, Air and Soil Pollut. – 1993. – Vol. 66, №1-2. – P. 59-76.
- [4] Патин С.А. Экологические проблемы освоения нефтегазовых ресурсов морского шельфа. – М.: Изд-во ВНИРО, 1997. – 350 с.
- [5] Иванов В.П., Сокольский А.Ф. Научные основы стратегии защиты биологических ресурсов Каспийского моря от нефтяного загрязнения. – Астрахань: Изд-во КаспНИРХа, 2000. – 181 с.
- [6] Vijay Kothari, MeeraPanchal, NamrataSrivastava Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview // Biotechnology Research International. – 2011. – Vol. 20. – P. 134-147.
- [7] Мукашева Т.Д. Выделение и отбор олиготрофных микроорганизмов, растущих на нефти и нефтепродуктах // Вестник КазГУ. Серия биологическая. – 2001. – №1 (13). – С. 10-14.
- [8] Хабибулина Ф.М., Шубакова А.А., Арчегалова И.Б., Романов Г.Г. Исследования способности нефтеокисляющих бактерий утилизировать нефть // Биотехнология. – 2002. – №6. – С. 57-62.
- [9] Daffonchio D., Fetter M., Mapelli F., Cherif A. Bioremediation of Southern Mediterranean oil polluted sites comes of age // New Biotechnology. – 2013. – Vol. 30. – P. 743-748.
- [10] ГОСТ 17.1.5.01-80 Охрана природы. Гидросфера. Общие требования к отбору проб донных отложений водных объектов для анализа на загрязненность. –М.: ИПК Издательство стандартов, 2002. – 7 с.
- [11] Практикум по микробиологии / Под.ред. А.Н. Нетрусова. – М.: Academia, 2005. – 597 с.
- [12] Саданов А.К., Айткельдиева С.А., Файзулина Э.Р., Ауэзова О.Н., Курманбаев А.А. Выделение и отбор активных нефтеокисляющих микроорганизмов из почв Кызылординской области //Материалы Междунар. науч.-практ. конф. «Актуальные проблемы вирусологии, микробиологии, гигиены, эпидемиологии и иммунологии», посв. 100-летию со дня рождения Жуматова Х.Ж. Алматы, 2012. - С. 149-150.
- [13] Лурье Ю.Ю. Аналитическая химия промышленных сточных вод. – М.: Химия, 1984. – 448 с.

REFERENCES

- [1] Lapina G.P., Chernavskaja N.M., Litvinovskij M.E., Sazonova S.V. Physical and chemical characteristics of environmental pollution in the man-made disasters (oil spill) // Chemical and Biological Safety, 2007, 1 (31), 24-32.
- [2] Bashkin V.N., Galiulin R.V., Galiulina R.A. Spills of hydrocarbons in the aquatic environment: problems and solutions // Protection of the environment in the oil and gas sector, 2010, 11, 4-7.

- [3] Amadi A., Dickson A.A., Maate G.O. Remediation of oil polluted soils. Organic and inorganic nutrient supplements on the performance of Maize //Water, Air and Soil Pollut.,**1993**, 66, 1-2, 59-76.
- [4] Patin S.A. Environmental problems of oil and gas resources of the sea shelf, **1997**, 350.
- [5] Ivanov V.P., Sokol'skij A.F. Scientific basis for strategies to protect the biological resources of the Caspian Sea by oil pollution, **2000**, 181.
- [6] Vijay Kothari, MeeraPanchal, NamrataSrivastava.*Biotechnology Research International*, **2011**, 20, 134-147.
- [7] Mukasheva T.D. Isolation and selection of oligotrophic microorganisms growing on oil and oil products // Vestnik KSU. Biological Series. - 2001. - №1 (13). - p. 10-14.
- [8]. Khabibullina F.M., Shubakova A.A., Archegalova I.B., Romanov G.G. Research capacity to dispose of the oil oxidizing bacteria // Biotechnology. - 2002. - №6. - p. 57-62.
- [9] Daffonchio D., Ferrer M., Mapelli F., Cherif A. NewBiotechnology, **2013**, 30., 743-748.
- [10] GOST 17.1.5.01-80 Protection of Nature. Hydrosphere. General requirements for sampling sediments of water bodies for analysis of pollution. -M.: Publisher IPC Standards, 2002. -7p.
- [11] Workshop on microbiology / ed. A.N. Netrusov, **2005**, 597.
- [12] Sadanov A.K., Ajtkel'dieva S.A., FajzulinaJe.R., Aujezova O.N., Kurmanbaev A.A. Isolation and selection of active oxidizing microorganisms from soils Kyzylorda oblast // Proceedings of the Intern. scientific and practical. Conf. "Actual problems of virology, microbiology, hygiene, epidemiology and immunology", dedicated to 100th anniversary of H.J. Zhumatov, **2012**, 149-150.
- [13] Lurie Y.Y. Analytical chemistry of industrial wastewater. - M.: Chemistry, 1984. - 448 p.

**СОЛТУСТИК КАСПИЙ ТЕҢІЗІНІң ЖАҒАЛАУЛЫҚ ТОПЫРАҒЫНАН БӨЛІНІП АЛЫНГАН
МҰНАЙТОТЫҚТЫРҒЫШ МИКРООРГАНИЗМДЕР ШТАМДАРЫНЫң
БЕЛСЕНДЛЕРІН ІРІКТЕУ**

**А. К. Саданов, С. А. Айткельдиева, Э. Р. Файзулина, О. Н. Әуезова, Л. Г. Татаркина,
Г. Б. Баймаханова, А. М. Нұрмұханбетова, Г. А. Спанқұлова**

РМК «Микробиология және вирусология институты» ҚР БФМ ФК, Алматы, Қазақстан

Тірек сөздер: мұнайтотықтырғыш микроорганизмдер, су түбінің қатпарлары, жағалаулық топырақтар, скрининг, деструкция, мұнайтотықтырғыш белсенділік.

Аннотация. Солтустік Каспий теңізінің жағалаулық топырақтары мен суынан, су түбінің қатпарларынан 125 бактерия культурасы белініп алынды. Жүргізілген скрининг, белініп алынған культурапалар Каспий өнірінің әртүрлі көн орны мұнайларының қоспаларын (Жанажол, Тенгіз, Бұзашы, Қашаған) әр калай пайдаға асыра алатындығын көрсетті. Ең белсенді 18 топырақтан, 7 судан және 12 су түбі қатпарларынан белілі алынған культурапалар болды. Оларды дақылданырығанда өскен коректік органдың бетінде мұнай қабыршағы жойылды, және биомассаның үлкен өсімі байқалды. Қалдықтың мұнайды гравиметриялық әдіспен анықтау нәтижесі бойынша 38,4-85,5% мұнай деструкцияланғандығы анықталды. Ең белсенділікті 11 топырақтан, 5 - су түбі қатпарларынан және бір ғана – жағалау суынан белінген культурапалар көрсетті. Олардың барлығы 14 тәуліктің ішінде 50% мұнайды пайдаға асырды.

Поступила 05.11.2015 г.